

海洋中药珍珠废弃壳中 ACE 抑制肽的研究

张天丰¹, 焦方泽¹, 白小妹¹, 梁智冰¹, 郑广篮¹, 侯小涛^{1,2,3}, 廖彭莹^{1*}

1. 广西中医药大学药学院, 广西 南宁 530200

2. 广西中医药大学 中药资源循环利用广西高校工程研究中心, 广西 南宁 530200

3. 广西中医药大学 广西中药药效研究重点实验室, 广西 南宁 530200

摘要: 目的 采用干湿结合策略系统挖掘珍珠 *Pteria martensii* 废弃壳蛋白质中潜藏的血管紧张素转化酶 (angiotensin converting enzyme, ACE) 抑制肽。方法 珍珠废弃壳经脱钙、透析处理得到珍珠层粉蛋白, 以 ACE 抑制活性和水解度为评价指标, 优选出最适蛋白酶。采用超滤和凝胶过滤色谱法对酶解物进行分离纯化, 通过液质联用技术 (LC-MS/MS) 对活性组分进行肽段鉴定。采用生物信息学工具筛选预测活性较高的肽段进行固相合成和体外 ACE 抑制活性验证。通过双倒数作图法 (Lineweaver-Burk) 对 ACE 的抑制动力学参数进行分析, 以判定活性肽的抑制作用类型。通过体外模拟消化实验分析活性肽的消化稳定性。采用分子对接技术探讨活性肽与 ACE 的相互作用和与 ACE N/C 端活性位点作用的差异性。采用分子动力学模拟探究活性肽与 ACE 复合物体系的结合稳定性与动态作用。结果 珍珠层粉蛋白经 8 种蛋白酶酶解后, 其中木瓜蛋白酶酶解物水解度为 (11.77±0.09)%, 抑制 ACE 的半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC₅₀) 为 (2.03±0.14) μg/mL, 酶解产物经分离纯化后得到活性组分 F1, IC₅₀ 为 (1.56±0.06) μg/mL, 从中共鉴定出 294 条肽段, 最终筛选出 9 条肽段进行固相合成与活性验证, 其中肽段 SPAR 活性最强, IC₅₀ 值为 (33.46±0.56) μmol/L, 对 ACE 抑制作用表现为混合型抑制。SPAR 经体外模拟消化后的保留率为 (23.6±4.9)%。分子对接中, SPAR 能与 ACE S1、S2 活性口袋中的关键氨基酸残基 Ala-354、Glu-384、Tyr-523、Gln-281、Lys-511 形成氢键作用。SPAR 与 ACE 的 N/C 端均能形成氢键相互作用, 对 C 端的结合能强于 N 端。SPAR-ACE 复合物在分子动力学模拟过程中表现出较好的构象稳定性和持续的相互作用。结论 通过干湿结合策略从珍珠废弃壳蛋白质中共筛选出 8 条新的活性肽, 其中肽段 SPAR 的 ACE 抑制活性最强, 为珍珠废弃壳的再利用提供了新的研究思路与方向, 干湿结合策略协同互补, 能够更高效地挖掘中药废弃物蛋白质潜藏的活性肽。

关键词: 珍珠废弃壳; 最适蛋白酶; 生物信息学; 血管紧张素转化酶抑制肽; 活性肽; 干湿结合

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2026)14-5428-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.14.006

Studies on ACE inhibitory peptides from waste pearl shells of *Pteria martensii* used in marine traditional Chinese medicine

ZHANG Tianfeng¹, JIAO Fangze¹, BAI Xiaomei¹, LIANG Zhibing¹, ZHENG Guanglan¹, HOU Xiaotao^{1, 2, 3}, LIAO Pengying¹

1. College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China

2. University Engineering Research Center of Reutilization of Traditional Chinese Medicine Resources, Nanning 530200, China

3. Guangxi Key Laboratory of Efficacy Study on Chinese Materia Medica, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China

Abstract: Objective To systematically identify potential angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from proteins in waste pearl shells of *Pteria martensii* using an integrated *in silico* and experimental (“dry-wet”) strategy. **Methods** Waste pearl shells

收稿日期: 2026-03-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81960698); 国家自然科学基金资助项目 (82560762); 2024 年度广西农作物废弃物功能成分研究协同创新中心开放基金项目 (CICAR 2024-Z3); 2025 年广西中医药大学研究生教育创新计划项目 (YCSY2025006); 广西特色中药现代产业学院 2024 年大学生创新创业训练计划项目 (C202411)

作者简介: 张天丰 (2000—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药化学。E-mail: 1281872962@qq.com

***通信作者:** 廖彭莹 (1984—), 女, 教授, 硕士生导师, 博士, 研究方向为中药化学成分研究与应用。E-mail: gxlpy@163.com

were subjected to decalcification and dialysis to obtain nacre proteins. The optimal protease was screened using ACE inhibitory activity and degree of hydrolysis as evaluation indicators. The enzymatic hydrolysates were separated and purified via ultrafiltration and gel filtration chromatography, and the peptide sequences of active fractions were characterized by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Bioinformatic tools were applied to predict and screen peptides with high potential ACE-inhibitory activity; candidate peptides were then prepared by solid-phase peptide synthesis (SPPS) and verified for their *in vitro* ACE inhibitory capacity. Lineweaver-Burk double-reciprocal plots were used to calculate enzyme kinetic parameters and define the inhibition mode of active peptides. An *in vitro* simulated gastrointestinal digestion assay was performed to evaluate the digestive stability of target peptides. Molecular docking was performed to investigate the interactions between the active peptide and ACE and to compare its interactions with the active sites in the N- and C-domains of ACE. Molecular dynamics (MD) simulations were conducted to assess the conformational stability and dynamic interaction characteristics of peptide-ACE complexes. **Results** Eight proteases were used to hydrolyze nacre proteins, among which papain hydrolysate showed a degree of hydrolysis of $(11.77 \pm 0.09)\%$ and a half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of $(2.03 \pm 0.14) \mu\text{g/mL}$ against ACE. After separation and purification, the active fraction F1 was harvested with an IC_{50} value of $(1.56 \pm 0.06) \mu\text{g/mL}$. A total of 294 unique peptides were identified from F1, and nine peptides with high predicted activity were selected for solid-phase synthesis and *in vitro* activity validation. Among all synthetic peptides, peptide SPAR exhibited the strongest ACE inhibitory activity with an IC_{50} of $(33.46 \pm 0.56) \mu\text{mol/L}$, and its inhibitory pattern against ACE was confirmed as mixed-type inhibition. After *in vitro* simulated gastrointestinal digestion, the retention rate of SPAR was $(23.6 \pm 4.9)\%$. Molecular docking results revealed that SPAR formed hydrogen bonds with key amino acid residues located in the S1 and S2 active pockets of ACE, including Ala354, Glu384, Tyr523, Gln281 and Lys511. SPAR was capable of binding to both the N-domain and C-domain of ACE, and displayed stronger binding affinity for the C-domain. MD simulation results demonstrated that the SPAR-ACE complex maintained favorable conformational stability and sustained intermolecular interactions throughout the simulation period. **Conclusions** Eight novel ACE inhibitory peptides were successfully screened from waste pearl shell proteins via the integrated dry-wet strategy, among which peptide SPAR possessed the optimal ACE inhibitory activity. This work provides a novel research perspective and technical route for high-value reutilization of discarded pearl shells. The complementary combination of *in silico* prediction and wet-lab experiments enables more efficient excavation of latent bioactive peptides from traditional Chinese medicine waste proteins..

Key words: waste shell of *Pteria martensii* (Dunker); optimal protease; bioinformatics; ACE inhibitory peptides; inhibitory peptides; dry-wet strategy

高血压作为全球性的公共卫生问题，易引发心脑血管疾病，近年来发病率在持续攀升^[1]。血管紧张素转化酶（angiotensin converting enzyme, ACE）是血压调控的核心靶点，传统 ACE 抑制剂虽能有效降低外周血管阻力，但约 20% 患者因干咳、血管性水肿等不良反应被迫停药^[2]，研究表明，ACE 的 N 端与 C 端结构域具有不同功能，C 端主要介导血管紧张素 II 生成，而 N 端与缓激肽降解相关，对 ACE 的 C 端选择性抑制可减少不良反应^[3]。如活性肽（bradykinin-potentiating peptides, BPPs）^[4]在 ACE 的 C 端和 N 端的表现抑制常数（ K_{iapp} 值）分别为 30 nmol/L 和 8 $\mu\text{mol/L}$ ，对 C 端表现出更强的抑制效力，对 N 端的影响则较弱。

海洋中药珍珠母是马氏珍珠贝 *Pteria martensii* (Dunker) 等双壳类动物的贝壳，始载于唐代《本草拾遗》^[5]，“烂壳为粉，饮下，主反胃，心胸间痰饮”，具有燥湿化痰、理气和胃的功效^[6]。据统计我国珍珠贝养殖规模已达数百万吨级，但珍珠养殖过程中

产生的大量珍珠废弃壳利用率不足 40%^[7]。实现珍珠废弃壳的高值化利用，有利于提升珍珠产业经济附加值^[8]，推动中药废弃物的再利用，也契合了当下的“双碳”发展理念^[9]。海洋中药珍珠母含有蛋白质、多肽、多糖等成分组成的有机基质^[10]，Sasaki 等^[11]从贝壳中分离鉴定了 ACE 抑制肽：甘氨酸-缬氨酸-甘氨酸-丝氨酸-脯氨酸-酪氨酸（Gly-Val-Gly-Ser-Pro-Tyr, GVGSPY），半数抑制浓度（median inhibition concentration, IC_{50} ）为 10.0 $\mu\text{mol/L}$ ，表明珍珠母有机基质中存在着具有 ACE 抑制活性的肽类成分。

传统酶解法通过定向水解蛋白质释放活性肽段，是获取天然活性肽的可靠手段，但其粗提物中复杂成分的干扰可能掩盖高活性片段^[12]。近年来，生物信息学技术的引入，为酶解产物筛选提供了高效工具^[13]：首先通过液相色谱-串联质谱（LC-MS/MS）对分离纯化后的酶解肽段进行质谱分析，通过 BIOPEP-UWM 生物活性肽数据库（BIOPEP-

UWM Database of Bioactive Peptides, <https://biochemia.uwm.edu.pl/about-biopep-uwm/>) 等生物信息学工具进行肽段的活性评分、水溶性和毒性的预测,有效筛选活性肽段。如刘华宇等^[14]从鳖蛋酶解物中鉴定的 29 条肽段中,筛选出 6 条活性预测评分较高的肽段,提升了研究效率。

本研究以海洋中药珍珠废弃壳为研究对象,采用干湿结合策略系统挖掘其中蕴含的 ACE 抑制肽,旨在提升 ACE 抑制肽的筛选效率。探究活性肽对 ACE 的抑制动力学及其对模拟胃肠道消化的稳定性,探究活性肽与 ACE 的相互作用以及与 ACEN/C 端活性位点相互作用的差异性,分析活性肽-ACE 复合物体系在分子动力学模拟的过程中的构象稳定性,为珍珠废弃壳的再利用提供新的研究思路与方向。

1 材料与仪器

1.1 材料与试剂

珍珠废弃壳于 2024 年 8 月采集于广西防城港江山镇白龙村意顺珍珠养殖场,为珍珠养殖户在养殖插核过程中直接废弃的病坏珍珠的壳部分,经广西中医药大学黄勇教授鉴定为马氏珍珠贝 *P. martensii* (Dunker) 的贝壳。木瓜蛋白酶(800 000 U/g)、中性蛋白酶(60 000 U/g)、碱性蛋白酶(200 000 U/g)、糜蛋白酶(1 200 U/mg)、Sephadex G-25 凝胶,北京索莱宝科技有限公司;胃蛋白酶(3 000 U/g)、胰蛋白酶(250 U/g)上海麦克林生化科技有限公司;菠萝蛋白酶(300 U/mg)上海源叶生物科技有限公司;ACE(1 U,源自兔肺)、马尿酸-组氨酸-亮氨酸(*L*-leucine-*N*-benzoyl-glycyl-*L*-histidyl, HHL)、甲醇、乙腈(均为色谱级)美国 Sigma-Aldrich 公司;实验用水为 Milli-Q 超纯水(电阻率 ≥ 18.2 M Ω ·cm)。

1.2 仪器与设备

BSA224S 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);雷磁 PHSJ-3F 实验室 pH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司);DHJF-2005 低温恒温搅拌反应浴(武汉亨泰达仪器设备有限公司)、C₁₈ 色谱柱(150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)、Reprosil-Pur 120 C₁₈-AQ(150 μ m $\times$ 170 mm, 1.9 μ m),德国 Dr. Maisch 公司;L-8900 氨基酸分析仪(日本日立公司);ST 16 低温离心机、Easy-nLC 1200 高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)仪、Q

Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer 质谱仪(美国赛默飞世尔科技公司);Alpha 1-2 LD Plus 冻干机(德国 Christ 公司);Concentrator Plus 真空离心浓缩仪(德国 Eppendorf 公司)。

2 方法

2.1 珍珠废弃壳的基本组成分析

2.1.1 珍珠废弃壳预处理 清洗珍珠废弃壳表面的附着物与污渍,除去最外层黑色的角质层和褐色的棱柱层,蒸馏水冲洗后干燥,置粉碎机中打粉即得珍珠层粉。称取珍珠层粉 25 g,以料液比(1:20)将珍珠层粉置于 0.8 mol/L 乙二胺四乙酸溶液中进行脱钙,4 $^{\circ}$ C 持续搅拌 60 h。脱钙结束后于 4 $^{\circ}$ C、1 000 $\times g$ 离心机中离心 30 min,保留上清液。将上清液置于 14 000 截留量的透析袋内,4 $^{\circ}$ C 透析 72 h,每 24 小时换液 2 次;对透析后的样品进行冻干,即得珍珠层粉蛋白样品。

2.1.2 灰分、蛋白质含量测定 灰分含量参照 GB 5009.4—2010《食品中灰分的测定》^[15]中的马弗炉灼烧法测定;蛋白质含量参照 GB 5009.5—2016《食品中蛋白质的测定》^[16]中的凯氏定氮法测定。

2.1.3 氨基酸测定 精密称取珍珠层粉蛋白样品 27.6 mg,按照 GB/T 5009.124—2016《食品中氨基酸的测定》^[17]方法进行水解氨基酸的测定。

2.2 废弃壳珍珠层粉蛋白的酶解

将珍珠层粉蛋白置于一定量超纯水中充分混匀,配制 8 份料液比为 1:20 混悬液,分别加入 8 000 U/g 木瓜蛋白酶(40 $^{\circ}$ C、pH 7.0)、菠萝蛋白酶(50 $^{\circ}$ C、pH 7.0)、中性蛋白酶(37 $^{\circ}$ C、pH 7.0)、碱性蛋白酶(40 $^{\circ}$ C、pH 8.0)、胃蛋白酶(37 $^{\circ}$ C、pH 2.0)、胰蛋白酶(37 $^{\circ}$ C、pH 7.8)、糜蛋白酶(37 $^{\circ}$ C、pH 7.8)和组合蛋白酶(胃蛋白酶、胰蛋白酶、糜蛋白酶),在最适酶解温度和酶解 pH 值条件酶解 5 h。酶解结束后,用 1 mol/L NaOH 溶液或 HCl 溶液调节 pH 值至中性,于 95 $^{\circ}$ C 水浴加热灭酶 15 min,冷却后在 4 $^{\circ}$ C 以 5 000 r/min 离心 20 min,收集上清液,冷冻干燥。测定各酶解物的水解度和 ACE 抑制活性,以二者为评价指标,优选最适蛋白酶。

2.3 水解度测定

采用 pH-Stat 法^[18]测定水解度,蛋白质酶解过程中伴随质子释放或吸收,其质子化程度与溶液 pH 相关,通过加入 NaOH 标准溶液或 HCl 标准溶液用于维持体系 pH,记录消耗的 NaOH 标准溶液或 HCl 标准溶液的量,按公式(1)计算水解度(DH)。

$$DH = B \times N_b \times 1/\alpha \times 1/MP \times 1/H_{tot} \times 100 \quad (1)$$

B 为加入 NaOH 标准溶液体积; N_b 为 NaOH 标准溶液浓度; α 为氨基离解度; MP 为底物中蛋白质总含量; H_{tot} 为底物蛋白质肽键总数。

2.4 体外 ACE 抑制活性测定

运用 HPLC 法测定各酶解物的 ACE 抑制活性^[19]。以 HHL 为底物, 测定生成马尿酸 (hippuric acid, HA) 的含量, 评价 ACE 抑制活性。取 60 μ L 样品溶液或空白硼酸盐缓冲液 (含 0.3 mol/L NaCl 的 0.1 mol/L 硼酸盐缓冲液, pH 8.3), 加入 40 μ L 0.10 U/mL ACE (用硼酸盐缓冲液溶解), 涡旋混匀, 37 $^{\circ}$ C 恒温反应 10 min, 再加入 40 μ L 5.40 mmol/L HHL 溶液 (用硼酸盐缓冲液溶解), 涡旋混匀, 37 $^{\circ}$ C 恒温反应 15 min, 最后加入 60 μ L 1 mol/L HCl 溶液终止反应。取 20 μ L 反应后溶液采用 HPLC 分析生成 HA 的量。色谱条件: C_{18} 色谱柱 (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为甲醇-0.1%磷酸溶液 (15:85); 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 228 nm。ACE 抑制率按式 (2) 计算。

$$ACE \text{ 抑制率} = (B - A)/B \times 100 \quad (2)$$

A 表示样品反应后溶液中 HA 峰面积; B 表示空白硼酸盐缓冲液反应后溶液中 HA 峰面积。

2.5 废弃壳珍珠层粉蛋白酶解物中 ACE 抑制活性成分的分离纯化

2.5.1 超滤法分离 称取适量酶解产物置于烧杯中, 加超纯水溶解并搅拌均匀。依次采用截留相对分子质量 10 000 与 3 000 的超滤离心管进行分离, 获得相对分子质量 >10 000、3 000~10 000 及 <3 000 的 3 个组分。各组分经冷冻干燥后测定 ACE 抑制率, 选取抑制效果最佳的组分开展下一步研究。

2.5.2 凝胶过滤色谱法分离 称取一定量超滤相对分子质量 <3 000 的组分, 加入超纯水并经涡旋混匀至完全溶解, 采用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤后上样至 Sephadex G-25 色谱柱中。以超纯水为洗脱溶剂, 每 5 mL 为 1 管收集洗脱液。以 220 nm 处吸光度 (A) 为纵坐标 (Y), 收集洗脱液的序号为横坐标 (X), 绘制洗脱曲线。各洗脱组分经冷冻干燥后测定其 ACE 抑制率, 选取抑制效果最佳的组分开展下一步研究。

2.6 肽段鉴定

将 Sephadex G-25 色谱柱分离的组分 F1 用 NH_4HCO_3 溶解, 进行还原烷基化处理: 加入 DTT 使终浓度为 10 mmol/L, 于 56 $^{\circ}$ C 水浴还原 1 h; 随

后加入 IAM 使终浓度为 20 mmol/L, 在室温避光条件下反应 40 min, 并加入 DTT (终浓度 10 mmol/L) 以中和未反应的 IAM。处理后的样品经 C18 Stage-Tip 脱盐、真空干燥后进行液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 分析。纳升级液相系统采用 Thermo Fisher Scientific Easy-nLC 1200, 质谱仪为 Q Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific)。

2.6.1 色谱条件 色谱柱为 Reprosil-Pur 120 C_{18} -AQ (150 μ m $\times$ 170 mm, 1.9 μ m), 流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液, 流动相 B 为含 0.1% 甲酸的 80% 乙腈溶液, 体积流量 600 nL/min。梯度洗脱: 0~2 min, 4%~8% B; 2~35 min, 8%~28% B; 35~55 min, 28%~40% B; 55~56 min, 40%~95% B; 56~66 min, 95% B。

2.6.2 质谱条件 质谱采用数据依赖采集 (data-dependent acquisition, DDA) 模式, 一级质谱参数: 分辨率 (Resolution) 设为 70 000, AGC target 目标值设为 3×10^6 , 最大离子注入时间 (maximum injection time) 设为 100 ms, 扫描范围 m/z 100~1 500; 二级质谱参数: Resolution 设为 17 500, AGC target 目标值设为 1×10^5 , Maximum injection time 设为 50 ms, TopN: 20, 归一化碰撞能 (NCE) 为 28。质谱原始数据采用 PEAKS Studio 11 进行数据库检索。uniprotkb_Pteriidae (family)_26_963_2025_08_28.fasta (序列总数: 26 963, 下载时间: 2025-08-28, 下载链接: <http://www.uniprot.org>) 检索参数设置为固定修饰 Carbamidomethyl (C), 可变修饰为 Oxidation (M) 和 Acetyl (Peptide N-term), 酶切方式为 Non-specific, 一级质谱质量偏差为 2×10^{-5} , 二级质谱质量偏差为 0.02。

2.7 肽段的生物信息学分析

将鉴定的肽段输入 BIOPEP 中, 检索肽段是否已报道过。使用在线工具 PeptideRanker 对肽段潜在生物活性进行预测, 采用在线工具 ToxinPred 对肽段的毒性进行预测, 挑选出 “Non-Toxin” 的肽段, 用 Innovagen 程序的 “Peptide property calculator” 工具预测肽段的水溶性, 用 admetSAR 预测肽段的 HIA 和 BBB 性质。通过 BIOPEP 中的 “profiles of potential biological activity” 程序评价肽段是否具有潜在的 ACE 抑制活性。

符合条件的肽段应为: PeptideRanker 活性评分 > 0.5、无毒、水溶性良好、人体肠道吸收好以及潜在

的 ACE 抑制活性大于 0。优选出活性评分较高的肽段,委托上海吉尔生物有限公司合成(纯度>98%),测定合成肽段的 ACE 抑制活性以进行活性验证。

2.8 活性肽的抑制动力学分析

肽段对 ACE 的抑制动力学分析参考 Bhaskar 等^[20]的方法并稍作修改。将不同浓度的活性肽与不同浓度的 HHL 按“2.4”项所述方法与 ACE 共同孵育,测定反应体系中马尿酸的生成量。采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法对抑制类型进行分析。米氏常数(K_m)和最大反应速度(V_{max})由 Lineweaver-Burk 方程计算,见公式(3)。竞争性抑制常数(K_i)和非竞争性抑制常数($K_{i'}$)分别根据斜率(Slope)和截距(Intercept)的二次线性回归关系,由式(4)和式(5)计算获得。

$$1/v = K_m/V_{max} \times 1/S + 1/V_{max} \quad (3)$$

$$\text{Slope} = K_m/V_{max} \times (1 + [I]/K_i) \quad (4)$$

$$\text{Intercept} = 1/V_{max} (1 + [I]/K_{i'}) \quad (5)$$

v 为初始反应速率; V_{max} 为最大反应速度; K_m 为米氏常数; K_i 为竞争性抑制常数; $K_{i'}$ 为非竞争性抑制常数; $[I]$ 表示抑制剂浓度; α 为表观系数, S 为底物 HHL 的浓度。

2.9 活性肽消化稳定性的预测与体外模拟消化

活性肽段消化稳定性预测采用 PeptideCutter 在线工具(https://web.expasy.org/peptide_cutter/)模拟胃肠道消化,选择胃蛋白酶(pepsin pH 1.3 和 pH>2.0)、胰蛋白酶(trypsin)与糜蛋白酶(chymotrypsin 高特异性和低特异性)对活性肽进行模拟酶切,预测肽的消化稳定性。

对活性肽进行体外模拟胃肠道消化,采用 Xiong 等^[21]的方法并进行了一些小的修改。将肽溶液(1 mg/mL,溶解于去离子水)用盐酸(1.00 mol/L)调节至 pH 3.0,然后加入胃蛋白酶(1 000 U/mL)。该溶液在避光条件下于摇床孵育(200.0 r/min, 37 °C) 2 h。随后,用氢氧化钠(1.00 mol/L)将肽溶液的 pH 调整至 7.5,并加入胰酶(50.0 U/mL)和糜蛋白酶(25 U/mL),在相同条件下继续孵育 2 h。最后,将混合物在水浴中加热 15 min 以终止反应。然后将混合物以 5 000 r/min 离心 15 min,收集消化产物上清液。同时,以未经消化的活性肽溶液作为对照,消化产物与活性肽溶液均经 0.22 μm 滤膜滤过后,进行 HPLC 分析。色谱条件如下: ChromCore AQ C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为含 0.1%的三氟乙酸的乙腈(A)-超纯水(B); 体积流量 1.0 mL/min,进样量 10 μL ,紫外检测波

长 220 nm,梯度洗脱: 0~25.0 min, 8.0%~33.0% A; 25.0~26.0 min, 33.0%~100.0% A; 26.0~30.0 min, 100.0% A, 30.0 min 停止。活性肽保留率的计算如公式(6)所示。

$$\text{保留率} = S_1/S_2 \quad (6)$$

S_1 为未酶解的肽质量; S_2 为总肽质量。

2.10 分子对接

首先从 AlphaFold (<https://alphafoldserver.com/>) 生成肽段的肽段结构并下载其 PDB 格式文件,然后从 RCSB Protein Data Bank 数据库中下载得到 ACE (PDB ID: 1O86)、ACE C 结构域 (PDB ID: 1O8A) 和 ACE N 结构域 (PDB ID: 2C6N) 的蛋白质结构,删除其晶体结构中的水分子、杂原子,加上氢原子等对其结构进行修饰。ACE 的活性对接位点坐标为 x : 40.581, y : 37.178, z : 43.454; 对接盒子大小为 7.400 nm×7.400 nm×7.400 nm。ACE 的 C 结构域活性对接位点坐标为 x : 40.562, y : 37.388, z : 43.476; 对接盒子大小为 6.895 nm×6.895 nm×6.895 nm。ACE 的 N 结构域活性对接位点坐标为 x : -21.544, y : -21.229, z : -63.629; 对接盒子大小为 10.950 nm×10.950 nm×10.950 nm。

2.11 分子动力学模拟

分子动力学模拟在 GROMACS 2025.4 软件中进行。体系采用 AMBER ff99SB-ildn 力场和 TIP3P 水模型。长程静电相互作用使用粒子网格 Ewald 法处理,实空间截断半径设为 1.0 nm。范德华相互作用的截断半径同样为 1.0 nm。化学键涉及氢原子的均使用 LINCS 算法进行约束。在位置约束下进行 100 ps 的 NVT 系综平衡,温度通过 V-rescale 方法耦合至 300 K,耦合常数为 0.1 ps。随后进行 1 ns 的 NPT 系综平衡,压力通过 C-rescale 方法耦合至 1×10^5 Pa,压力耦合常数为 5.0 ps,温度耦合常数调整为 0.5 ps。最后在此条件下进行 10 ns 的分子动力学模拟。

2.12 数据统计与分析

所有结果均以 3 次独立实验的 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 Excel 2025 软件进行数据处理,采用 Graphpad Prism 10 软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示具有显著性差异。

3 结果

3.1 废弃壳珍珠层粉基本组成分析

珍珠层粉的蛋白质质量分数为 $(3.31 \pm 0.06)\%$,灰分的质量分数为 $(93.53 \pm 0.30)\%$,珍珠层粉经脱钙及透析处理后得到珍珠层粉蛋白,珍珠层粉蛋

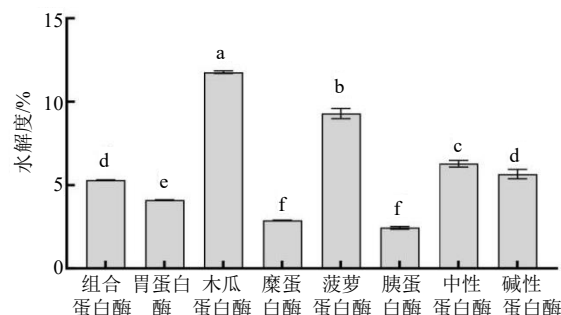
白的蛋白质质量分数为 $(52.53 \pm 1.27)\%$ 。珍珠层粉经过脱钙与透析的处理后，蛋白质的质量分数显著提高，说明上述方法有效提取了珍珠层粉中的蛋白质。

废弃壳珍珠层粉蛋白的氨基酸组成分析结果如表 1 所示，共检出 17 种氨基酸。研究表明，Asp、Glu 和苯丙氨酸 (Phe) 是活性肽类药物中的常见氨基酸^[22]，珍珠层粉蛋白中这 3 种氨基酸占总氨基酸含量的 23.07%，在这 3 种氨基酸中 Asp 的含量占比 (13.50%) 最大，Asp 属于酸性氨基酸，带负电荷，可螯合 ACE 活性中心带正电荷的锌离子，抑制 ACE 活性^[23]。有研究指出 ACE 抑制肽中多含有疏水性氨基酸，其中 Pro 对抑制活性贡献最大，其次是 Tyr、Val 和 Leu^[24]。此外，含有 Tyr 的肽段如 AY

(Ala-Tyr)、LY (Leu-Tyr) 和 IY (Ile-Tyr) 等是选择性抑制 ACE C 端结构域的有利结构^[25]。珍珠层粉蛋白中还含有大量的疏水性氨基酸 (31.10%)，疏水性氨基酸的存在有利于形成具有 ACE 抑制活性的肽段。

3.2 酶解物的水解度和 ACE 抑制活性

水解度测定结果如图 1 所示，木瓜蛋白酶酶解物的水解度最高，为 $(11.77 \pm 0.09)\%$ ，显著高于其余 7 种蛋白酶酶解物 ($P < 0.05$)。阳性药卡托普利与各酶解物 ACE 抑制活性的测定结果如图 2 所示，酶解物质量浓度为 0.01 mg/mL 时，木瓜蛋白酶酶解物的 ACE 抑制率也最高，为 $(78.71 \pm 0.19)\%$ ，测定其 IC_{50} 值为 $(2.03 \pm 0.14) \mu\text{g/mL}$ 。大多数 ACE 抑制肽的 C 端氨基酸残基包含疏水性氨基酸，木瓜蛋白酶作为巯基水解酶，其活性中心可特异性识别并切割疏水性氨基酸及非极性氨基酸残基，这种独特的酶解特性有利于生成富含疏水氨基酸的短肽片段^[26]。基于不同的评价指标对酶的选择存在差异，在本研究中，综合考虑各酶水解度和酶解产物的 ACE 抑制活性，选取木瓜蛋白酶作为本研究中最适蛋白酶。



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)，图 2、3、5、9、11 相同。
Different lowercase letters indicate significant differences at $P < 0.05$; the same statistical notation applies to Figures 2, 3, 5, 9 and 11.

图 1 不同蛋白酶对废弃壳珍珠层粉蛋白的水解度
Fig. 1 Effects of different proteases on degree of hydrolysis of nacre powder protein from waste pearl shells

3.3 超滤法分离组分分析

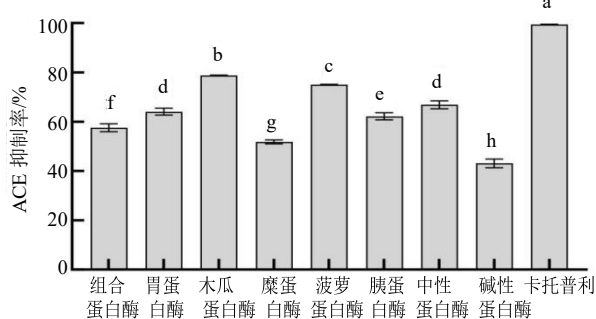
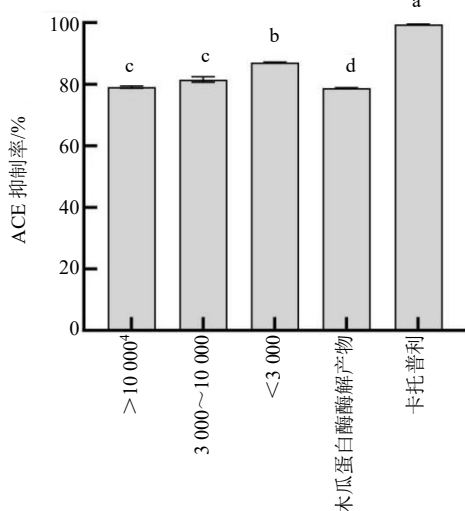
超滤法是一种基于半透膜孔径分离的技术，通过选择性截留小分子多肽实现多肽的浓缩、脱盐及纯化^[27]。如图 3 所示，经超滤后，所得相对分子质量 $< 3\,000$ 组分、 $3\,000 \sim 10\,000$ 组分的 ACE 抑制率均显著高于木瓜蛋白酶酶解物的 ACE 抑制率 ($P < 0.05$)，低相对分子质量肽段因结构紧凑且空间位阻较小，能更高效地嵌入 ACE 酶活性中心，进而调控其催化功能^[28]。本研究中，相对分子质量 $< 3\,000$ 的

表 1 废弃壳珍珠层粉蛋白的氨基酸组成
Table 1 Amino acid composition of nacre powder protein from waste pearl shells

氨基酸	质量分数/(mg·g ⁻¹)	占比/%
天冬氨酸 (Asp)	33.5	13.50
苏氨酸 (Thr)	5.3	2.14
丝氨酸 (Ser)	15.2	6.12
谷氨酸 (Glu)	14.0	5.64
甘氨酸 (Gly)	52.2	21.03
丙氨酸 (Ala)	37.5	15.11
半胱氨酸 (Cys)	0.8	0.32
缬氨酸 (Val)	7.9	3.18
甲硫氨酸 (Met)	0.3	0.12
异亮氨酸 (Ile)	6.5	2.62
亮氨酸 (Leu)	18.1	7.29
酪氨酸 (Tyr)	12.4	5.00
苯丙氨酸 (Phe)	10.0	4.03
赖氨酸 (Lys)	8.6	3.46
组氨酸 (His)	3.0	1.21
精氨酸 (Arg)	16.0	6.45
脯氨酸 (Pro)	6.9	2.78
氨基酸总量	248.2	100.00
必需氨基酸 (EAA)	56.7	22.84
非必需氨基酸 (NEAA)	159.3	64.18
疏水性氨基酸	77.2	31.10
芳香族氨基酸	22.4	9.02

质量分数为氨基酸在珍珠层粉蛋白中的质量分数；占比为氨基酸与氨基酸总量的比值。

Mass fraction refers to the mass percentage of each amino acid in nacre protein; proportion represents the ratio of each amino acid to the total amino acids.

图 2 不同蛋白酶酶解物的 ACE 抑制率 ($n=3$)Fig. 2 ACE inhibitory activity of enzymatic hydrolysates produced by different proteases ($n=3$)图 3 超滤法分离所得组分的 ACE 抑制率 ($n=3$)Fig. 3 ACE inhibitory activity of fractions obtained by ultrafiltration ($n=3$)

组分 ACE 抑制率最高, 质量浓度为 0.01 mg/mL 时, ACE 抑制率为 $(87.05 \pm 0.12)\%$, 进一步测定相对分子质量 $< 3\ 000$ 组分的 IC_{50} 值为 $(1.70 \pm 0.07)\ \mu\text{g/mL}$, 选取其进行下一步纯化。

3.4 Sephadex G-25 色谱法分离组分分析

将超滤所得相对分子质量 $< 3\ 000$ 组分经 Sephadex G-25 色谱分离, 洗脱曲线如图 4 所示, 共获得 2 个组分 (F1 和 F2), 测定这 2 个组分的 ACE 抑制率, 如图 5 所示。质量浓度为 0.01 mg/mL 时, 组分 F1 的 ACE 抑制率为 $(84.93 \pm 0.20)\%$, 显著高于组分 F2 ($P < 0.05$), 测定组分 F1 的 IC_{50} 值为 $(1.56 \pm 0.06)\ \mu\text{g/mL}$ 。综合考虑, 选择组分 F1 进行下一步的研究。

3.5 肽段鉴定

通过 LC-MS/MS 分析活性组分 F1, 得到的总

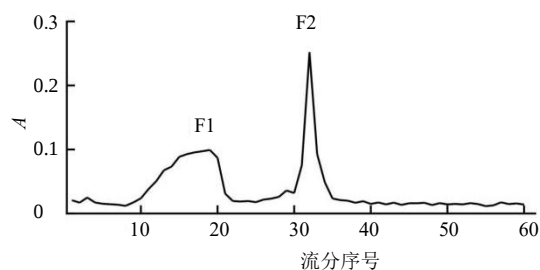
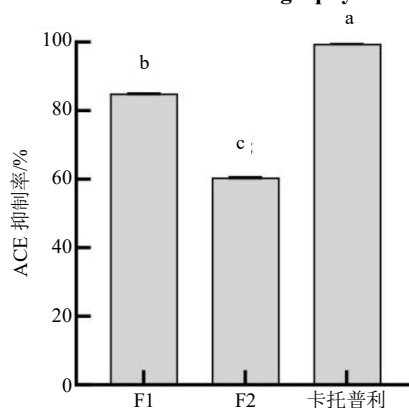


图 4 Sephadex G-25 色谱分离洗脱曲线

Fig. 4 Elution profile obtained by Sephadex G-25 gel filtration chromatography

图 5 Sephadex G-25 分离所得各组分的 ACE 抑制率 ($n=3$)Fig. 5 ACE inhibitory activity of fractions obtained from Sephadex G-25 gel filtration ($n=3$)

离子流图如图 6 所示。利用 PEAKS Studio 软件鉴定 F1 中的肽段, 去除鉴定得分低于 15 及峰面积为 0 的肽段, 共鉴定出 294 条肽段, 这些肽段相对分子质量为 206.09~1 641.68, 氨基酸序列长度集中于 2~10。研究表明, 当肽段 C 端残基中含有疏水氨基酸 (如 Leu、Ala 和 Val 等) 时, 可以增强多肽与 ACE 活性中心疏水位点的结合力, 形成竞争性抑制, 增强肽段的 ACE 抑制活性^[29]。当活性肽的 N 端是 Phe、Tyr、Ala、Trp、Pro 和 Gly 时, 也有利于提高活性肽的 ACE 抑制活性^[30]。分析已鉴定的 294 条肽段的 C/N 端氨基酸残基组成, 结果如图 7、8 所示。C 端氨基酸残基主要为 Gly, 还含有较多的疏水性氨基酸 Ala 和 Val; N 端氨基酸残基主要为 Gly, 其次是 Leu、Ala。

3.6 肽段的生物信息学分析

已鉴定 295 条肽段中共有 78 条在 PeptideRanker 评分大于 0.5, 且还未作为 ACE 抑制活性肽报道过。这 78 条肽段在 Innovagen 程序的水溶性预测结果中, 有 10 条肽段显示水溶性良好, 在

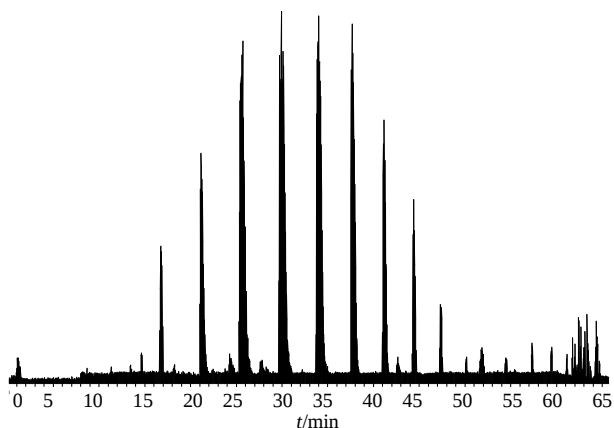


图 6 组分 F1 的总离子流图

Fig. 6 Total ion chromatogram of fraction F1

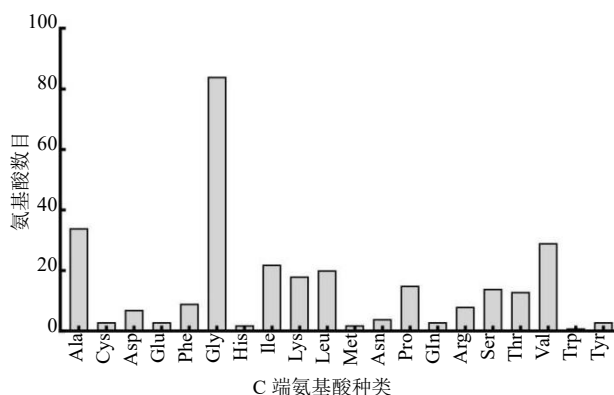


图 7 已鉴定肽段 C 端氨基酸残基种类

Fig. 7 Types of amino acid residues at C-termini of identified peptides

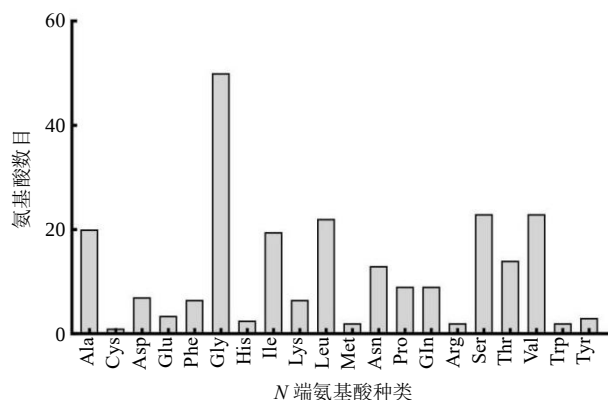


图 8 已鉴定肽段 N 端氨基酸残基种类

Fig. 8 Types of amino acid residues at the N- and C-termini of identified peptides

ToxinPred 的肽段毒性预测结果中均显示无毒性,使用 ADMETlab 预测也均表现出良好的人体肠道吸收、血脑屏障通透性。这 10 条肽段在 BIOPEP-UWM 数据库预测潜在 ACE 抑制活性,有 9 条肽段的 A 值大于 0,最终筛选结果见表 2。

将筛选的 9 条肽段进行固相合成和体外 ACE 抑制活性验证,结果见图 9。其中肽段 AFR 无 ACE 抑制活性,另外 8 条肽段在质量浓度为 1 mg/mL 时均具有不同程度的 ACE 抑制活性,其中肽段 SPAR 具有较好的 ACE 抑制活性,显著高于另外 8 条肽 ($P < 0.05$),测定其 IC_{50} 值为 $(33.46 \pm 0.56) \mu\text{mol/L}$ 。

3.7 活性肽的抑制动力学分析

通过使用 Lineweaver-Burk 图研究抑制肽 SPAR 对 ACE 的抑制模式。如图 10 所示,不同浓度的 SPAR 对 ACE 的抑制曲线都呈线性拟合并相交于第二象限,且随着 SPAR 的浓度增高, K_m 升高, $V_{\max}$ 明显下降,表明 SPAR 的抑制作用类型为混合型抑制。抑制常数 (K_i) 是评估 ACE 与抑制剂结合能力的重要参数^[31], $1/K_i$ 值越高表明抑制剂与 ACE 的结合亲和力越强。由表 3 可知,SPAR 的 K_i 值和 K_i' 值分别为 153.19、239.23 $\mu\text{mol/L}$, K_i/K_i' 的值低于 1,且 K_i 值低于 K_i' 值,表明在混合型抑制中以竞争型抑制占主导地位,意味着 SPAR-ACE 复合物的结合能力高于 SPAR-ACE 复合物-底物。

3.8 活性肽的消化稳定性分析

肽段 SPAR 消化稳定性的预测结果见表 4,SPAR 经历胃蛋白酶 (pH 1.3 和 pH > 2.0)、胰蛋白酶、糜蛋白酶消化均没有被酶切。为了进一步确定 SPAR 的消化稳定性,取 SPAR 经过体外模拟消化后的产物与 SPAR 进行对比分析,测定二者的 ACE 抑制活性,如图 11 所示,1 mg/mL 质量浓度下,SPAR 消化产物的 ACE 抑制率显著低于 SPAR,测定 SPAR 经胃肠道模拟消化后的保留率为 $(23.6 \pm 4.9) \%$ 。说明 SPAR 经过体外模拟消化后部分被酶切,导致其 ACE 抑制活性下降。

3.9 分子对接

使用 Autodock Vina 进行肽段 SPAR 与 ACE (PDB:1086)、ACE C 端 (PDB:108A)、ACE N 端 (PDB:2C6N) 的分子对接,SPAR 对接结果见图 12~14 和表 5。当结合能小于 0 时,结合能的值越低,表示结合越紧密,肽段 SPAR 与 ACE、ACE C 端、ACE N 端的结合能分别为 -5.9、-8.2、-6.7 kJ/mol。氢键对于肽与 ACE 之间形成相互作用具有重要意义^[32],SPAR 与 ACE 共形成了 7 条氢键;与 ACE C 端形成了 9 条氢键;与 ACE N 端形成了 6 条氢键。进一步分析 SPAR 与 ACE 活性位点的相互作用,SPAR 与 ACE S1 活性口袋中的关键氨基酸残基 Ala-354、Tyr-523、Glu-384 形成了氢键作用,并

表 2 肽段生物信息学分析结果
Table 2 Bioinformatics analysis results of peptides

肽序列	评分	水溶性	毒性	口服吸收性	血脑屏障透过性	ACE 抑制肽段出现频率	来源蛋白质
GGEGLGGLG	0.61	良好	无	+	+	0.89	未命名蛋白 (A0AA88YXP4)
DFI	0.74	良好	无	+	+	0.33	SWIM 型锌指结构域蛋白 (A0AA89BPD0)、逆转录酶 (A0AA88YAZ7)、F-box 结构域蛋白 (A0AA88YJV3)、磺基转移酶结构域蛋白 (A0AA88YQJ5)、未命名蛋白 (A0AA88XRP2、A0AA89BUP2、A0AA89BZG1、A0AA88XDE5)
DLF	0.89	良好	无	+	+	0.67	中间丝杆状结构域蛋白 (A0AA88XKR9)、SMG7 蛋白 (A0AA88XTQ3)、金属内肽酶 (A0AA88XXY5)、SH3 结构域蛋白 (A0AA88XZH5)、过氧化物酶 (A0AA88Y4K7)、DnaJ 同源蛋白 B 亚家族 9 号成员 (A0AA88YAB0)、肌球蛋白重链 (A0AA89BHS4)、肽基脯氨酰顺反异构酶 (A0AA89BWU0)、酪氨酸酶铜结合结构域蛋白 (A0AA89BXI1)、AAA+ATP 酶结构域蛋白 (A0AA89C0D8)、网状钙结合蛋白 3 (A0AA89C5W6)、ATP 依赖型 RNA 解旋酶 (A0AA89C7K8)、2 型几丁质结合结构域蛋白 (A0AA88Y9Y9)、未命名蛋白 (A0AA88XUL4、A0AA88YEX8、A0AA88YU48、A0AA88YVZ0、A0AA88YXP4、A0A075M0X4、A0AA88XCU8)
DIF	0.80	良好	无	+	+	0.33	纤维蛋白原 C 端结构域蛋白 (A0AA88XUZ3)、分泌型蛋白 (A0AA88Y5Y2)、CD109 抗原蛋白 (A0AA88YC92)、S1 型肽酶结构域蛋白 (A0AA88YHD8)、C1q 结构域蛋白 (A0AA88YNH3)、EGF 样结构域蛋白 (A0AA88YSN4)、AAA+ATP 酶结构域蛋白 (A0AA89C0D8)、半胱氨酸合酶 1 (A0AA89C2X9)、C 型凝集素结构域蛋白 (A0AA89C759)、未命名蛋白 (A0AA88XME9、A0AA88Y505、A0AA88Y9I4、A0AA88YEX8、A0AA89BV73、A0AA89C9V5)
FDFG	0.97	良好	无	+	+	0.75	含 TIR 结构域蛋白/Toll/白介素 1 受体同源结构域蛋白 (A0AA89BQ03)
FKGG	0.80	良好	无	+	+	0.75	ZIP4/12 型 EF 手锌转运蛋白 (A0AA88YI72)、未命名蛋白 (A0AA89C3G3)
PKGL	0.52	良好	无	+	+	0.50	AAA+ATP 酶结构域蛋白 (A0AA89C0D8)
AFR	0.91	良好	无	+	+	0.67	EF 手型钙结合结构域蛋白 (A0AA89C360)、金属内肽酶 (A0AA88XXY5)、ShKT 结构域蛋白 (A0AA88Y0A6)、V(D)J 重组激活蛋白 1 (A0AA89BNL7)、C3H1 型锌指结构域蛋白 (A0AA88YUZ5)、酪氨酸酶铜结合结构域蛋白 (A0AA88YVU6)、HIT 结构域蛋白 (A0AA89BZZ3)、未命名蛋白 (A0AA88XQ81、A0AA88Y921、A0AA88YSD1、A0AA89C0Q4、A0AA89C5L0、A0AA89CB71)
SPAR	0.53	良好	无	+	+	0.50	SH3 结构域蛋白 (A0AA88YF74)、半胱氨酸合酶 1 (A0AA89C2X9)

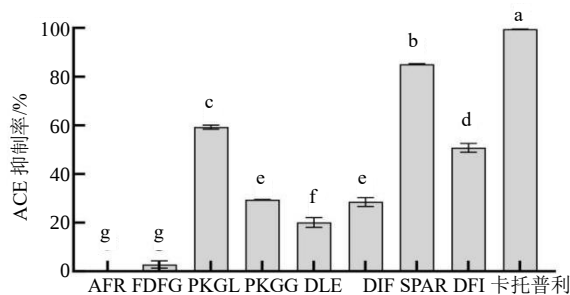


图 9 合成肽的 ACE 抑制活性 ($n = 3$)

Fig. 9 ACE inhibitory activity of synthesized peptides ($n = 3$)

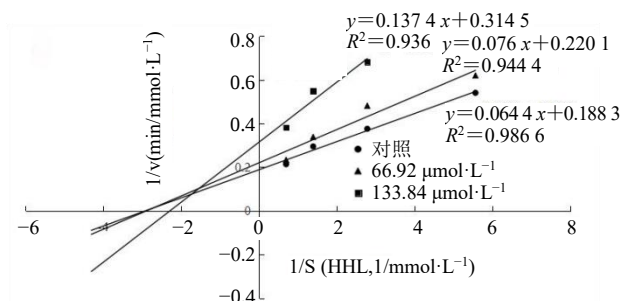


图 10 肽段 SPAR 对 ACE 的 Lineweaver-Burk 图

Fig. 10 Lineweaver-Burk plot of ACE in presence of peptide SPAR

表 3 肽段 SPAR 抑制血管紧张素转化酶的动力学参数

Table 3 Kinetic parameters of ACE inhibition by peptide SPAR

体系	C (肽段 SPAR) / ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	抑制类型	$V_{\text{max}}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min})$	$K_m/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	$K_i/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	$K_{i'}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$
ACE	0	—	5.31	0.34	—	—
SPAR+ACE	66.92	混合型	4.54	0.35	153.19	239.23
	133.84		3.18	0.44		

表 4 SPAR 消化稳定性预测

Table 4 Predicted digestive stability of peptide SPAR

蛋白酶	SPAR
pepsin pH 1.3	无酶切
pepsin pH > 2.0	无酶切
trypsin	无酶切
chymotrypsin high specificity	无酶切
chymotrypsin low specificity	无酶切

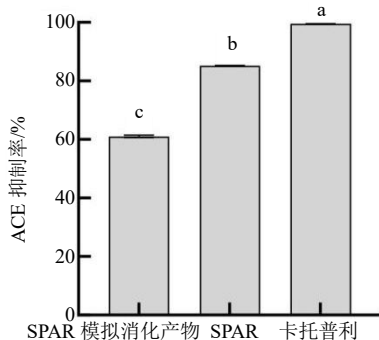


图 11 SPAR 和其模拟消化产物 ACE 抑制率 ($n = 3$)

Fig. 11 ACE inhibitory activity of simulated digestive products of peptide SPAR ($n = 3$)

与 ACE S2 活性口袋中的 Gln-281、Lys-511 形成了氢键作用,这些氢键作用都是在 ACE C 端结构域中形成的,而 C 端结构域是 ACE 主要的催化活性中心,在酶的底物识别和抑制剂结合过程中发挥核心作用。综上,SPAR 与 ACE C/N 端相互作用的差异性在于,SPAR 与 C 端结构域的结合能值最低,

形成的氢键数为最多,对 ACE C 端显现出了更强的亲和力。其次,在对接的活性位点上,SPAR 与处于 C 端结构域活性口袋中的多个关键氨基酸残基形成氢键相互作用,这表明 SPAR 能够有效占据 ACE 的底物结合位点,具有作为偏向竞争性抑制的潜在结构基础,这也与“3.7”项下对 SPAR 抑制动力学分析的结论相一致,为 SPAR 对 ACE 的混合型抑制作用中以竞争性抑制为主进一步提供了依据。

3.10 分子动力学模拟

分子动力学模拟是基于物理立场模拟蛋白质-配体复合物在一定时间尺度内构象变化与相互作用行为的一种计算方法,探究复合物在时间尺度上的构象变化与稳定性^[33]。均方根偏差 (root mean square deviation, RMSD) 用于评估复合物体系的稳定性,如图 15-a 所示,在 10 ns 模拟过程中,ACE 以及 SPAR-ACE 体系的 RMSD 整体波动较小, RMSD 值稳定在 0.05~0.25 nm,表明复合物在模拟时间内保持在相对稳定的构象。均方根涨落 (root mean square fluctuation, RMSF) 是用于衡量蛋白各残基在模拟过程中的柔性变化,蛋白质残基的 RMSF 的值越大,其灵活性就越高。如图 15-b 所示,SPAR-ACE 复合物体系的 RMSF 值基本稳定在 0.3 nm 以下,说明体系的稳定性好,柔性低。回转半径 (Rg) 反映蛋白整体构象的紧致程度。如图 15-c 所示,SPAR-ACE 复合物体系模拟过程中, Rg 值

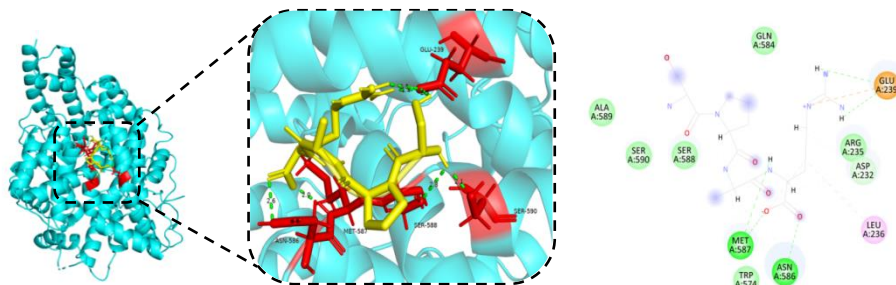


图 12 肽 SPAR 与 ACE 对接的放大图 (左) 和细节图 (右)

Fig. 12 Enlarged view (left) and detailed view (right) of molecular docking of peptide SPAR with ACE

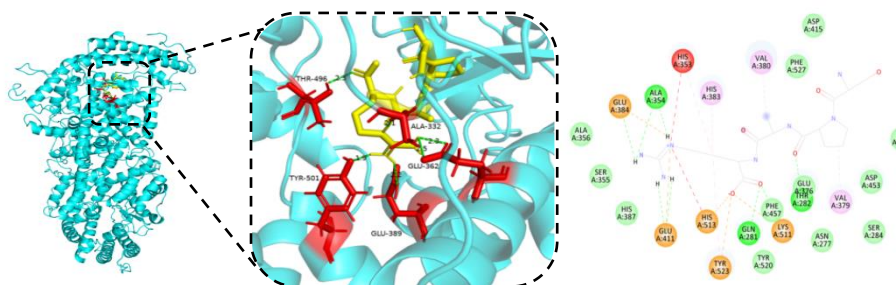


图 13 肽 SPAR 与 ACE C 端对接的整体图 (左) 和细节图 (右)

Fig. 13 Enlarged view (left) and detailed view (right) of molecular docking of peptide SPAR with C-terminal domain of ACE

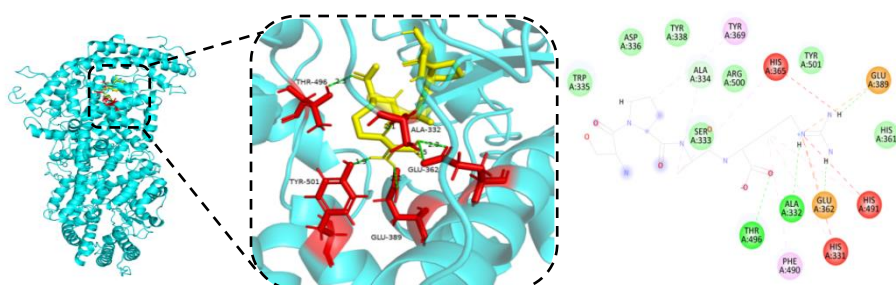


图 14 肽 SPAR 与 ACE N 端对接的整体图 (左) 和细节图 (右)

Fig. 14 Enlarged view (left) and detailed view (right) of molecular docking of peptide SPAR with N-terminal domain of ACE

表 5 肽与 ACE 的对接结果

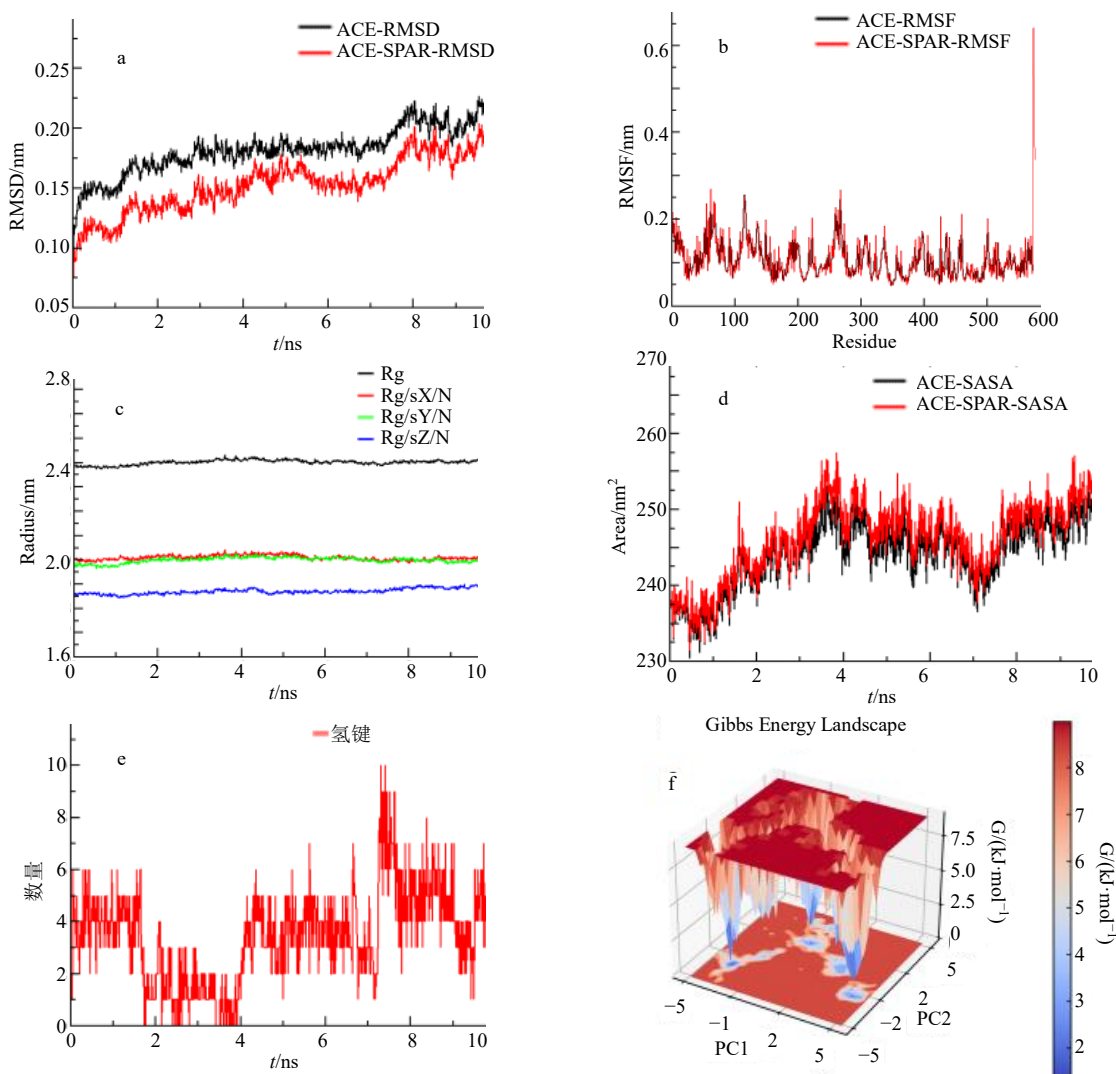
Table 5 Molecular docking results of peptides with ACE

蛋白质结构	肽序列	结合能/ (kcal·mol ⁻¹)	氢键数	作用残基	氢键长度/Å
ACE 全链	SPAR	-5.9	7	Asn-586、Met-587、Ser-588、Ser-590、 Glu-239	2.0、2.0、2.8、2.1、2.5、 1.8、2.5
ACE C 结构域	SPAR	-8.2	9	Ala-354、Glu-384、His-383、Tyr-523、 Lys-511、Gln-281、Thr-282	2.3、2.5、2.5、2.7、2.8、 2.3、2.1、2.1、2.1
ACE N 结构域	SPAR	-6.7	6	Ala-332、Glu-389、Tyr-501、Glu-362、 Thr-496	2.1、2.2、1.9、2.3、2.5、 2.3

1 kcal·mol⁻¹ = 4.184 kJ·mol⁻¹; 1 Å = 0.1 nm.

仅呈现轻微波动,说明复合物整体构象未发生显著松散与塌缩,始终保持结构紧致性。为进一步确证 Rg 的变化,研究了 SPAR-ACE 复合物体系的溶剂可及表面积(solvent accessible surface area, SASA),SASA 反映蛋白质或复合物与溶剂之间的相互作用

特征,如图 15-d 所示,体系在模拟过程中 SASA 值波动稳定,说明未发生显著构象展开,整体结构相对稳定。氢键是肽与 ACE 之间对接的关键作用,如图 15-e 所示,SPAR 与 ACE 之间可形成 1~10 个氢键,平均维持 4 个左右,表明 SPAR 与 ACE 之间



a-RMSD 随时间的变化; b-RMSF 随时间的变化; c-Rg 随时间的变化; d-SASA 随时间的变化; e-氢键数; f-自由能景观图。
a-RMSD over time; b-RMSF over time; c-Rg over time; d-SASA over time; e-number of hydrogen bonds; f-free energy landscape.

图 15 SPAR 的分子动力学模拟

Fig. 15 Molecular dynamics simulation results of peptide SPAR

存在持续的相互作用,有助于复合物在模拟时间内的稳定结合。自由能景观(gibbs energy landscape, GEL)用于描述体系在模拟过程中的构象分布特征,如图 15-f 所示,复合物分布于若干低自由能区域,其在短时间尺度内也存在较为稳定的构象状态。综上,SPAR-ACE 复合物在分子动力学模拟过程中表现出较好的构象稳定性和持续的相互作用,为阐明 SPAR 与 ACE 的结合模式及其潜在抑制机制提供了分子水平的理论依据。

4 讨论

在国家“双碳”战略与绿色可持续发展理念的背景下,对中药废弃资源进行合理的再生利用有助

于中药资源利用效率的提高,利于中药产业的绿色发展。目前对中药废弃资源利用的主要方式包括药效成分的再提取、肥料化、基质化、饲料化和添加剂等。如黄芪作为废料的非药用部位仍富含多种活性成分,其经提取得到的总黄酮表现出一定的抗氧化和抗菌活性,因此针对中药固体废弃物中的活性成分,可以采用再提取技术实现废弃物资源的二次利用。海洋中药珍珠母常在复方珍珠降压胶囊、牛黄降压丸等中药复方中应用,取用的是珍珠层粉,所以针对珍珠母废弃壳的资源,可以选择对其中的潜在活性成分进行探索与开发,为其再利用提供新的研究思路。

相比已有的珍珠资源研究,本研究以珍珠母废弃壳为研究对象,创新性采用了干湿结合的研究策略,首次从珍珠母废弃壳的珍珠层粉蛋白中筛选出了新的 ACE 抑制肽 SPAR,显现了从珍珠母废弃壳资源中开发生物活性肽的潜力,为珍珠废弃壳资源的深度利用提供新的价值导向。活性肽如果能在不显著抑制 ACE N 端活性位点的情况下,有效抑制 ACE C 端的活性,可以减轻或避免某些心血管疾病治疗中的副作用症状,提高药物的安全性。这种选择性可以使得 ACE 抑制剂使其在心血管疾病的治疗中具备更好的应用前景。本研究通过分子对接技术,进一步对比分析了 SPAR 与 ACE C 端、N 端之间形成的相互作用,发现相比 N 端,SPAR 能与处于 C 端结构域活性口袋中的多个关键氨基酸残基形成氢键相互作用,结合能也更低,表现出对 ACE C 端结构域更强的亲和力,SPAR 对 ACE C 端是否具有选择性的抑制效果还有待开展进一步的研究。SPAR 在分子动力学模拟过程中也表现出较好的构象稳定性和持续的相互作用。总的来说,本研究采用干湿结合的策略,从珍珠废弃壳的珍珠层粉蛋白中筛选出新的 ACE 抑制肽,在中药复杂的蛋白质体系中对活性肽进行了有效筛选,提升了 ACE 抑制肽的筛选效率。但采用的生物信息学方法也仍有优化空间,结合当前日趋成熟的机器学习技术,有望进一步提升中药活性成分筛选的高效性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 《中国心血管健康与疾病报告》编写组,王增武.《中国心血管健康与疾病报告 2024》:心血管疾病及其危险因素流行状况 [J]. 中国心血管病研究, 2025, 23(9): 771-793.
- [2] 杨志操.牛乳中血管紧张素转换酶抑制肽的潜在价值与研究进展 [J]. 中国乳业, 2023(5): 82-86.
- [3] da Silva R L, Papakyriakou A, Carmona A K, *et al.* Peptide inhibitors of angiotensin-I converting enzyme based on angiotensin (1-7) with selectivity for the C-terminal domain [J]. *Bioorg Chem*, 2022, 129: 106204.
- [4] Cotton J, Hayashi M A F, Cuniassé P, *et al.* Selective inhibition of the C-domain of angiotensin I converting enzyme by bradykinin potentiating peptides [J]. *Biochemistry*, 2002, 41(19): 6065-6071.
- [5] 陈藏器.《本草拾遗》辑释 [M]. 合肥:安徽科学技术出版社, 2002: 251.
- [6] 胡玉莹,杨贵雅,陈安珍,等.海洋中药珍珠母的研究进展 [J]. 中国现代中药, 2024, 26(12): 2189-2196.
- [7] 程海艳,盖广清.废弃贝壳的资源化利用现状 [J]. 建材技术与应用, 2022(6): 29-33.
- [8] 陈晓军,常力丹,刘雯雯,等.贝壳废弃物资源化利用研究进展 [J]. 山东化工, 2023, 52(13): 82-84.
- [9] 龙旭,卢莹磊,王珂莹,等.中药固体废弃物的能源化发展:“双碳”经济转型中的机遇与挑战 [J]. 中草药, 2025, 56(6): 1877-1887.
- [10] 李昇,彭海生,杨波,等.珍珠粉药理活性及药用价值研究进展 [J]. 特产研究, 2025, doi: 10.16720/j.cnki.tcyj.2025.070.
- [11] Sasaki C, Tamura S, Tohse R, *et al.* Isolation and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from pearl oyster (*Pinctada fucata*) shell protein hydrolysate [J]. *Process Biochem*, 2019, 77: 137-142.
- [12] 王静,王立霞,任彩霞,等.食源性 ACE 抑制肽的制备方法与作用机制研究进展 [J]. 中国食物与营养, 2025, 31(4): 21-28.
- [13] 孙华菊.丝胶蛋白源 ACE 抑制多肽的筛选及其抑制机理研究 [D]. 南宁:广西大学, 2018.
- [14] 刘华宇,廖彭莹,张天丰,等.鳖蛋黄血管紧张素转化酶抑制肽分离纯化及活性分析 [J]. 食品科学, 2025, 46(1): 40-48.
- [15] 食品中灰分的测定: GB/T 5009.4—2003 [S]. 2004: 1-4.
- [16] 食品中蛋白质的测定: GB/T 5009.5—2003 [S]. 2004: 1-3.
- [17] 食品中氨基酸的测定: GB/T 5009.124—2003 [S]. 2004: 2-3.
- [18] 徐英操,刘春红.蛋白质水解度测定方法综述 [J]. 食品研究与开发, 2007, 28(7): 173-176.
- [19] Lahogue V, Réhel K, Taupin L, *et al.* A HPLC-UV method for the determination of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity [J]. *Food Chem*, 2010, 118(3): 870-875.
- [20] Bhaskar B, Ananthanarayan L, Jamdar S. Purification, identification, and characterization of novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from alcalase digested horse gram flour [J]. *Lwt*, 2019, 103: 155-161.
- [21] Xiong W Y, Zhang Y, Guo L X, *et al.* Effects and mechanisms of a novel peptide LADW on angiotensin I-converting enzyme and vascular function and its gastrointestinal stability: An *in vitro* and *in silico* study [J]. *Food Biosci*, 2025, 71: 107345.
- [22] 杨璐,杨贺棋,庞一帆,等.分子对接技术在生物活性肽构效关系中的研究进展 [J]. 食品科技, 2024, 49(11): 1-10.
- [23] Cozier G E, Lubbe L, Sturrock E D, *et al.* ACE-domain selectivity extends beyond direct interacting residues at the

- active site [J]. *Biochem J*, 2020, 477(7): 1241-1259.
- [24] 吴长平. 大豆 ACE 抑制肽的选择性制备及其作用机理研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2019.
- [25] Denti P, Sharp S K, Kröger W L, *et al.* Pharmacokinetic evaluation of lisinopril-tryptophan, a novel C-domain ACE inhibitor [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2014, 56: 113-119.
- [26] 胡霄, 黄业传, 管思彤, 等. 分子动力学模拟 NaCl 对木瓜蛋白酶活性的影响 [J]. *中国酿造*, 2025, 44(1): 163-168.
- [27] 陈慧. 长牡蛎肽促骨生成活性机制研究 [D]. 大连: 大连工业大学, 2019.
- [28] 马思洋, 马晓蕊, 吴月, 等. 枸杞籽粕 ACE 抑制肽制备工艺的优化 [J]. *食品研究与开发*, 2025, 46(13): 105-114.
- [29] 杨泽瑶, 许静, 王江雪, 等. 牛骨源血管紧张素转换酶抑制肽的鉴定与表征 [J]. *食品与发酵工业*, 2025, 51(13): 234-242.
- [30] 胡学佳, 戴致远, 张晓岷, 等. 海洋源降血压肽研究进展 [J]. *中国食品学报*, 2022, 22(8): 353-363.
- [31] Jahanbani R., Ghaffari M., Vahdati K., *et al.* Kinetics Study of Protein Hydrolysis and Inhibition of Angiotensin Converting Enzyme by Peptides Hydrolysate Extracted from Walnut [J]. *Int. J. Pept. Res. Ther*, 2018, 24: 77-85.
- [32] Zaharuddin N D, Barkia I, Wan Ibadullah W Z, *et al.* Identification, molecular docking, and kinetic studies of six novel angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) seed [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 220: 1512-1522.
- [33] 李萌, 张捷凯, 何弼璐, 等. 鲍源 ACE/ACE2 双靶点活性肽的分离及其活性分析 [J]. *食品科学*, 2025, 46(19): 124-133.

[责任编辑 王文倩]